

**ANREICHERUNG EINES
LEBERZELLPROLIFERATIONSFAKTORS
AUS ADULTEN TEILHEPATEKTOMIERTEN
RATTEN**

Hubertus Schneider

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549007_0041

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Experimentelle Medizin
Martinsried bei München
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

ANREICHERUNG EINES LEBERZELLPROLIFERATIONSFAKTORS
AUS ADULTEN TEILHEPATEKTOMIERTEN RATTEN

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hubertus Schneider
aus
München
Jahr
1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Nov. 1980



MEINEN ELTERN

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von August 1978 bis August 1980 in der Abteilung für Experimentelle Medizin am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer und Herrn Dr. M. Goldberg danke ich für die vielseitige Förderung und Unterstützung der Arbeit

1. Einleitung	3
2. Befunde nach Teilhepatektomie	4
2.1 DNA-Synthese und Mitosewellen	4
2.2 Polyploidien	6
2.3 Biochemische und elektronenoptische Befunde	6
2.4 Größe der Zellen	7
3. Modifizierende Faktoren der Regeneration	7
4. Regelnde Mechanismen	8
5. Problemstellung der Arbeit	10
6. Material und Methoden	13
6.1 Verwendete Geräte	13
6.2 Verwendete Chemikalien	13
6.3 Versuchstiere und Haltung	14
6.4 Operation	14
6.5 Circadianrhythmus	15
6.6 Leber- und Blutentnahme aus teilhepatekto- mierten Ratten.	17
6.7 Herstellung der proliferationsaktiven Extrakte	17
6.7.1 Extrakte aus teilhepatektomierten Lebern	17
6.7.2 Extrakte aus dem Plasma teilhepatekto- mierter Ratten	18
6.8 Meßmethode zur Bestimmung der Proliferations- aktivität der verschiedenen Extrakte	19
6.9 Isolierung der DNA aus Leberzellkernen	19
6.9.1 Gewinnung der Leberzellkerne	19
6.9.2 Extraktion der DNA	21
6.10 Messung der Anflutung des radioaktiven Thymidins	22

7. Ergebnisse	24
7.1 Spezifische Aktivität des radioaktiven Thymidineinbaus in die DNA der Leberzellkerne bei den Kontrolltieren	24
7.2 Proliferationsaktivität des Faktors LT 200 aus teilhepatektomierten Rattenlebern	24
7.3 Proliferationsaktivität des Faktors PT NEU 200 aus dem Plasma teilhepatektomierter Ratten	25
8. Besprechung	25
9. Zusammenfassung	31
10. Literaturverzeichnis	32

1. Einleitung

Die Leber ist ein Organ mit einer außerordentlich großen Regenerationskraft. Dies wird leicht übersehen, da ein Leberausfallskoma bei einer fulminant nekrotisierenden oder chronisch aggressiven Hepatitis oder einer terminalen Lebercirrhose in der Regel das Schicksal des Patienten besiegelt. Die neuere experimentelle Bearbeitung der Leberzellregeneration wurde durch die Arbeit von Higgins und Anderson(10) eingeleitet, deren relativ einfache Methode einer gut reproduzierbaren 2/3-Teilhepatektomie das Tor zur modernen Leberforschung aufstieß. Nach einer 2/3-Teilhepatektomie hat die Leber etwa am 10. postoperativen Tag ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht, was die Proliferationspotenz vieler maligner Tumoren weit übertrifft. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß sogar nur 1/10 der ursprünglichen Lebermasse ausreicht, um noch eine volle Regeneration zu bewirken(2).

Die Regenerationskapazität der Leber wird auch durch folgende Ergebnisse belegt:

Im Rahmen einer ausführlichen histologischen Studie führten Simpson und Finckh(20) (1963) an der Ratte in 5-7 wöchigen Abständen bis zu 5 Teilhepatektomien durch und kamen dabei zu folgenden Ergebnissen: Nach der 5. Teilhepatektomie zeigte das lichtmikroskopische Schnittpräparat eine im Wesentlichen normale Läppchenstruktur bei völliger defekt-

freier Wiederherstellung der komplexen Zytoarchitektur, mit Portalfeldern, Sinusoiden und Zentralvenen, sowie dem strikt vom Blutstrom abgetrennten Kompartiment der Gallencanaliculi. Die partielle Hepatektomie bietet gegenüber anderen Modellen der Leberzellproliferationsforschung, wie z.B. dem Tetra-chlorkohlenstoffmodell einen entscheidenden Vorteil: Bei diesen Modellen bewirkt die Einwirkung von Leberzellgiften eine diffuse Parenchymschädigung, während bei einer Teilhepatektomie die Regeneration von vollkommen intakten, in einem unversehrten Gewebsverband liegenden Zellen ausgeht.

2. Befunde nach Teilhepatektomie

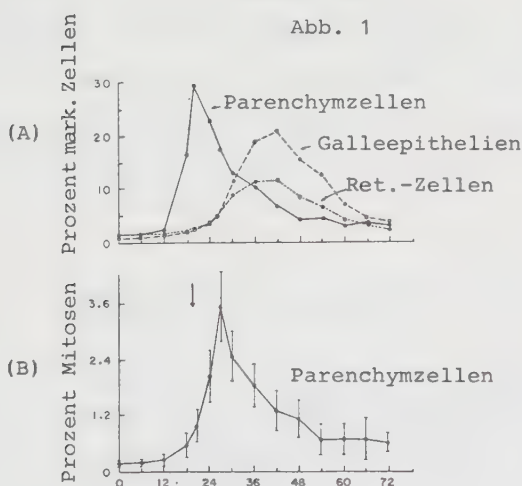
2.1 DNA-Synthese und Mitosewellen

14-16 Stunden nach Teilhepatektomie kommt es bei der Ratte zu einem steilen Anstieg der DNA-Synthese, deren Gipfel etwa bei 22 Stunden liegt. Der Gipfel der Mitosenwelle folgt mit ungefähr 6-7 stündiger Verspätung nach. Ein zweiter, aber nicht mehr sehr ausgeprägter Mitosegipfel liegt bei etwa 48 Stunden; dessen Kinetik ist aber stark vom Circadianrhythmus der endogenen DNA-Synthese überlagert(1). Der erste Gipfel soll in seiner Höhe und in seinem zeitlichen Auftreten, zumindest bei ausgewachsenen Ratten, vom Circadianrhythmus kaum beeinflusst sein(1).

Von großer Wichtigkeit ist die Tatsache, daß die Mitosen der Parenchymzellen nicht zufällig über die ganze Leber verteilt

sind, sondern zuerst periportal, also in der Lappchenperipherie auftreten, um dann in Richtung der Zentralvene fortzuschreiten und langsam abzubauen (9).

Das Mitosemaximum der Gallengangsepithelien und der retikulären Zellen ist um ungefähr 24 Stunden gegenüber dem der Parenchymzellen verschoben (Abb. 1).



Stunden nach Teilhepatektomie

- (A) Prozentzahl der Parenchymzellen, die nach 2-stündiger ^3H -Thymidininkorporation zu bestimmten Zeitpunkten nach Teilhepatektomie markiert sind.
- (B) Mitoseindex der Hepatozyten zu entsprechenden Zeitpunkten.
- Modifiziert nach Grisham (9).

2.2 Polyploidien

In der Leber neugeborener Ratten findet man fast nur mononukleare diploide Zellen. Mit zunehmendem Alter der Tiere treten in steigendem Maße mehrkernige polyploide Hepatozyten auf, bis in der ausgewachsenen Ratte etwa 20-30% zweikernig diploide und 60-70% tetraploide Zellen vorhanden sind. Der Proliferationsschub nach Teilhepatektomie verschiebt das Ungleichgewicht weiter zugunsten der mehrkernig polyploiden Zellen(9). So gelten auch in der menschlichen Leber polyploide Großkerne als langdauernde Residuen von Regenerationsvorgängen nach Parenchymschädigungen.

2.3 Biochemische und elektronenoptische Befunde

Kaum übersehbar ist die Zahl der Arbeiten, die versuchen, über eine Analyse der Stoffwechselvorgänge der regenerierenden Leberzelle dem Proliferationsmechanismus auf die Spur zu kommen. Dabei wurden viele Beiträge geleistet, den Metabolismus der sich teilenden Zelle weiter aufzuhellen. Es wurde jedoch keine Antwort auf die Frage nach dem auslösenden Mechanismus der Mitose im Bereich des Stoffwechsels gefunden. Ebenso wenig konnten die zahlreichen elektronenmikroskopischen Studien eine Antwort auf diese Frage vermitteln. Außerdem scheint es möglich, daß viele scheinbar teilhepatektomiespezifischen Befunde auf eine unzureichende Fixationstechnik zurückzuführen sind (4).

2.4 Größe der Zellen

Zwei von einander unabhängige Regelkreise kennzeichnen die Säugetierleber.

- (1) Die Regulation des mittleren Volumens der Leberzellen, welches mit dem Körpergewicht korreliert ist (24).
- (2) Die Regulation der Zahl der Leberzellen. Diese ist bei jugendlichen und erwachsenen Tieren ungefähr gleich und beträgt bei der Ratte ca. 5×10^8 Zellen. Zellen, Zellkerne und Nukleoli beginnen sich ab der 6.-12. Stunde nach Teilhepatektomie zu vergrößern, und verdoppeln ihr Volumen bis zur 24. Stunde (23).

3. Modifizierende Faktoren der Regeneration

Die Leberregeneration wird von vielen Faktoren beeinflusst, die auch bei anderen Regenerationsvorgängen eine Rolle spielen. So wirken sich z.b. Hungern, Stress in verschiedenen Formen, Antimetabolite und Bestrahlung negativ aus. Die Höhe der Regenerationsantwort ist weiter abhängig vom Ausmaß des resezierten Leberanteils: je mehr Zellen entfernt werden, umso höher ist der Mitoseindex des Restgewebes. Diese Beziehung gilt nur bis zu einer 2/3-Hepatektomie. Wird darüberhinaus Lebergewebe entfernt, kommt es wahrscheinlich aufgrund einer metabolischen Überladung der Restleber zu einer Verminderung der Regenerationsantwort. Die Untersuchungen des Einflusses der verschiedenen Hormone

ergaben zusammengefasst, daß Hypophysen-, Nebennieren- und Schilddrüsenhormone in Auslaß- oder Substitutionsexperimenten den Proliferationsprozess beeinflussen, aber keines für die Regenerationsantwort unbedingt notwendig ist.

4. Regelnde Mechanismen

Zwei Grundtheorien über die regelnden Mechanismen stehen sich gegenüber. Das Modell eines Hemmstoffs des Zellwachstums und die Vorstellung von einem proliferationsaktiven Faktor:

Das Hemmstoffmodell besagt im Wesentlichen, daß normalerweise irgendwo im Körper ein Inhibitor gebildet wird, dessen verminderte Konzentration nach einer Teilhepatektomie in den verbliebenen Zellen eine Teilung ermöglicht.

Im Gegensatz dazu nimmt die Theorie der aktiven Faktoren an, daß die Teilhepatektomie einen Reiz darstellt, der an einer bestimmten Stelle des Organismus die Bildung eines proliferationsaktiven Faktors auslöst, der in der Leberzelle einen Stimulus ausübt, der die ruhende Zelle in die Mitose drängt. Zur Klärung dieser Frage wurden Extrakte und Homogenate aus teilhepatektomierten Lebern in normale Tiere und vice versa gespritzt. In gleicher Weise wurden auch Plasmaübertragungen vorgenommen. Doch kam es bei diesen Arbeiten immer wieder zu widersprüchlichen Ergebnissen, die zum Teil durch unterschiedliche Versuchsbedingungen und Nichtbeachtung von Stressfaktoren und der Circadianrhythmik bedingt gewesen sein mögen(5). In letzter Zeit mehren sich jedoch die Belege

für das Konzept eines oder mehrerer aktiver Faktoren, das auch durch eine Reihe von Befunden an Autotransplantaten erhärtet wird.

So verpflanzten Sigel B. et al.(19) in Hunden Autotransplantate in den Nacken. Diese wurden mit arteriellem Blut versorgt, das entweder in physiologischer Weise von der Portalseite eintrat und über die Zentralvene abfloss, oder umgekehrt über die Zentralvene in Richtung der Portalvene drainiert wurde. Bei portalseitiger arterieller Durchblutung nach Teilhepatektomie fand sich das bekannte Verteilungsmuster der Mitosen, mit abfallender Häufigkeit in Richtung der Zentralvene. War der Blutstrom jedoch entgegengesetzt gerichtet, zeigte sich ein genau umgekehrtes Bild.

Wäre der humorale Faktor ein Hemmstoff, so käme es durch Rezeptorbesetzung zu einem stetigen Verbrauch in Richtung des abfließenden Schenkels, sodaß in diesem Bereich auch die Hemmwirkung am geringsten wäre, und er der Ort der höchsten Mitosefrequenz sein müsste.

Der oftmals erhobene Befund der von den Portalfeldern ausgehenden Mitosewelle(10) spricht ebenfalls für das Modell einer portalen Anflutung eines aktiven Faktors, seinem Verbrauch in Richtung der Zentralvene und seiner Mitose induzierenden Wirkung in diesem Bereich erst zu einem Zeitpunkt, da die Rezeptoren der peripheren Zellen abgesättigt sind.

Moolten und Bucher (15) zeigten in einem Kreuzperfusionsexperiment, daß das Blut einer teilhepatektomierten Ratte in der Leber eines normalen Tieres die DNA-Synthese stimuliert

und Mitosen induziert. Die Perfusion musste jedoch mindestens 8-12 Stunden bestehen und erst nach 18 Stunden wurde eine maximale Stimulierung erreicht.

5. Problemstellung der Arbeit

Ruhenstroth-Bauer et al.(18) und Goldberg et al.(7), beschrieben die Wirkung eines Proliferations-aktiven Extrakts aus der Leber und dem Plasma teilhepatektomierter, 95-105g schwerer Ratten. Der Leberextrakt wird 12 Stunden post operationem aus teilhepatektomierten Restlebern durch Ansäuerung(pH 5.5) und anschließende Hitzedenaturierung (95°C) gewonnen. Der Plasmaextrakt wird ebenfalls 12 Stunden post operationem aus dem Plasma teilhepatektomierter Ratten durch Ansäuerung(pH 5.5) und anschließende Hitzedenaturierung (95°C) gewonnen. Zur Aktivierung des Plasmaextrakts ist eine Enzymbehandlung mit Neuraminidase erforderlich, was für den Leberextrakt nicht notwendig ist. Abgesehen von diesem Unterschied zeigen beide Faktoren folgende Gemeinsamkeiten.

- (1) Intraperitoneal in normale Tiere appliziert, lösen die Faktoren gegenüber den mit NaCl-Lösung gespritzten Kontrolltieren eine 3-4 fache Steigerung der DNA-Synthese und einen gleich großen Anstieg der Mitosen aus.
- (2) Leber- und Plasmaextrakte aus scheinoperierten Ratten, zeigen jeweils nur die Kontrollwerte der mit NaCl-Lösung gespritzten Tiere.
- (3) Beide Faktoren sind hitzestabil, organspezifisch und

nicht speziesspezifisch.

- (4) Der Leberfaktor(=LT) und der Neuraminidasebehandelte Plasmafaktor(=TPNeu) stimulieren auch in vitro die Hepatozyten zu erhöhtem Thymidineinbau.
- (5) Bei allen Chromatographieschritten verhalten sich die Faktoren gleich und erscheinen im selben Gipfel.
- (6) Bei den Enzymbehandlungen mit Trypsin-Chymotrypsin oder β -Galaktosidase werden die Faktoren in gleicher Weise inaktiviert.
- (7) Für beide Faktoren ergibt sich ein fast identisches apparentes Molekulargewicht (37000 ± 4000 D bzw. 38000 ± 5000 D). Auch bei der Bestimmung der Stokesschen Radien zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung (2.65 ± 0.2 bzw. 2.55 ± 0.2 nm) (8).

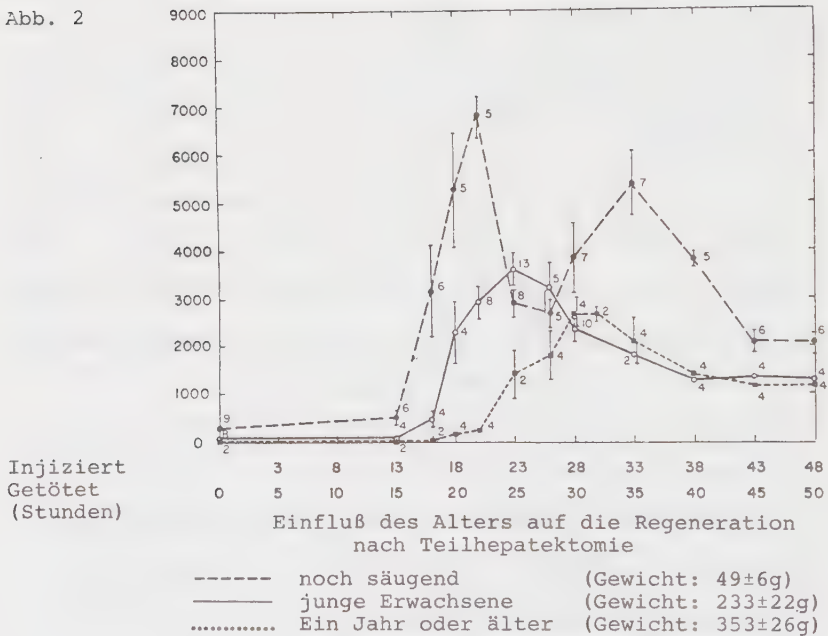
Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgende Schlußfolgerung ziehen:

Bei dem Leber- und Plasmaextrakt handelt es sich um ein und denselben Faktor. Dieser ist ein Glykoprotein mit entständiger Galaktose und besitzt ein apparentes Molekulargewicht von etwa 38000 D.

Diese Ergebnisse wurden bisher an 95-105 g schweren Testratten gewonnen. Es war aber wichtig herauszufinden, ob diese Befunde spezifisch für ein wachsendes System sind oder auch genauso für das ausgewachsene Tier zutreffen, dessen Regenerationskinetik sich vom jungen Tier unterscheidet(3) (Abb. 2). Dies wird in

vorliegender Arbeit untersucht.

Abb. 2



Die Ratten bekamen intravenöse ^{14}C -Thymidininjektionen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Zahlen bezeichnen die Anzahl der Tiere/Messpunkt, die vertikalen Balken die Standardabweichungen der Mittelwerte.

Modifiziert nach Bucher (3).

6. Material und Methoden

6.1 Verwendete Geräte

Potter-Homogenisator, Typ 853202,

Braun Melsungen

Schüttelmaschine, Eigenbau, MPI für Biochemie, München

IEC/B60 Ultrazentrifuge, Biotronik München.

Minifuge 2, Heraeus-Christ, Osterode/Harz. UV-Lampe, Original

Hanau NN 30/89 Sterisol F 1137 L5,

Hanau Quarzlampen, Hanau

Beckman DB Spektralphotometer,

Beckman Instruments GmbH, München.

PH-Meter PHM 26

Radiometer Kopenhagen.

Intertechnique SL 30 Flüssigkeitsscintillationszähler,

Intertechnique Multi 8 Computer

Deutsche Intertechnique GmbH, Mainz

150u-Maschennetz,

Fa. Breitsamer München.

6.2 Verwendete Chemikalien

Asid Bonz, Böblingen:

Narkoseäther DAB 7

Amersham-Buchler, Braunschweig:

6-3H-Thymidin, 25 Ci/mmol

Behringwerke Marburg/Lahn:

Neuraminidase (Vibrio Comma, 1U/ml)

Promonta, Hamburg:

Heparin (200 I.E. Heparin Natrium in 2ml)

Serva, Heidelberg:

DNA (Lachssperma), Chymotrypsin (Pankreas), Trypsin
(Pankreas), Pronase P (Streptomyces griseus)

Zinsser, Frankfurt:

Quickscint 212

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt,
bezogen und waren von pro analysi Qualität.

6.3 Versuchstiere und Haltung

Bei allen Versuchen wurden weibliche, spezifisch pathogen freie (SPF) Wistar-Ratten, mit einem Gewicht von 200-220g verwendet (Institut für Strahlen- und Umweltforschung Neuherberg). Die Tiere sind 30 Generationen ingezüchtet, sodaß sie untereinander histokompatibel sind, was besonders für Gewebsextraktspitzungen und mögliche Immunreaktionen von Bedeutung ist. Sie wurden in Makrolonkäfigen bei 22° C und 50±5% Luftfeuchtigkeit bei natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und bekamen Wasser und Altromin 1324 ad libitum.

6.4 Operation

Die Teilhepatektomien wurden nach Higgins und Anderson vorgenommen(10). Diese von ihnen 1931 beschriebene Standard-

methode einer 2/3-Teilhepatektomie an Ratten ist deshalb von Bedeutung, weil sie durch einfache Schlingenlegung um den mittleren und linken Lappen eine standardisierte 2/3-Resektion der Leber ohne besondere Blutstillung gestattet. Das ausgezeichnete Immunsystem der Ratten macht eine Asepsis zur Verhütung abdomineller Infektionen überflüssig. Die Narkose war eine Äthernarkose. Das Abdomen wurde durch Längsincisur entlang der Linea alba bis zum Xiphoid eröffnet. Die links- und rechtsseitige Bauchhälfte wurde an je einem Haltefaden aufgespannt, um einen guten Zugang zum Operationsgebiet zu ermöglichen. Dann wurde mit steriler Wundheftseide die oben erwähnte Schlinge gelegt und zugezogen. Die erfolgreiche Unterbindung der Gefäßversorgung kann man an der augenblicklich eintretenden zyanotischen Verfärbung des abgeschnürten Leberteils erkennen.

Nach der Resektion wurden Muskel und Haut in fortlaufender Nahttechnik genäht. Auf saubere Adaptation der Wundränder wurde dabei besonders geachtet. Nach der Operation bekamen die Tiere bis zur Tötung wieder Wasser und Altromin 1324 ad libitum.

6.5 Circadianrhythmus

In der Gewebssklassifizierung nach Bizzozero (1894) zählt die Leber wie etwa auch die Nieren und die glatte Muskulatur zu den stabilen Geweben. In ihnen wird nur ein geringes Maß an Zellneubildung beobachtet, welches dem Ersatz abgestorbener Zellen dient. Diese endogene Mitoseaktivität unterliegt jedoch einem Circadianrhythmus(12), welcher mit Regenera-

tionszyklen z.B. nach einer Teilhepatektomie interferiert(1) und in Betracht gezogen werden muß, um zu reproduzierbaren und vergleichbaren Resultaten zu kommen. Vor allem bei ganz jungen Tieren, wo das Gleichgewicht von Zelluntergang und Zellneubildung zugunsten der Zellneubildung verschoben ist, kommt der circadianen Mitoserhythmik besondere Bedeutung zu(11).

Um diese Tagesschwankungen in der endogenen DNA-Synthese nicht als zusätzlichen Parameter in die Regenerationsmessung eingehen zu lassen, wurden Operationen, Extraktspritzungen und Tötung immer zu definierten Zeitpunkten vorgenommen. Der Tötungszeitpunkt lag grundsätzlich wie auch schon bei Ruhenstroth-Bauer et al.(18) und Goldberg et al.(7) zwischen 8.00 und 10.00 Uhr. Bucher et al.(3) zeigten an ausgewachsenen Ratten, daß das DNA-Synthesemaximum nach 2/3-Teilhepatektomie 22 Stunden post operationem ist. Dies bedeutet gegenüber dem noch wachsenden Tier eine Verzögerung der Regenerationsantwort um etwa zwei Stunden. Da die Empfindlichkeit der DNA-Markierung am höchsten im Synthesemaximum ist, wurde der Zeitpunkt der Extraktspritzung zwischen 11.00 und 12.00 Uhr gelegt. Auch bei dem Auftreten des Proliferationsfaktors wurde eine Verschiebung von zwei Stunden angenommen, sodaß die Teilhepatektomien für die Extraktgewinnung immer zwischen 18.00 und 20.00 Uhr durchgeführt wurden.

6.6 Leber- und Blutentnahme aus teilhepatektomierten Ratten.

14 Stunden nach Teilhepatektomie wurde das Abdomen breit eröffnet. Nach Darstellung der Aorta descendens bis zur Iliacalgabel wurde die linke Arteria iliaca mit einer chirurgischen Pinzette fixiert, und die Entblutung mit einer heparinisierten Spritze durch Punktion der Aorta an der Iliacalgabel vorgenommen. Pro Tier konnten auf diese Weise 5-6ml Blut gewonnen werden.

Daraufhin erfolgte die Eröffnung des Thorax mit Durchtrennung sämtlicher transdiaphragmaler Gefäße. Sodann wurde die Leber über die Portalvene mit 0.9% physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, bis sich ihre Farbe deutlich aufgehellt hatte. Die 1/3-Restlebern wurden nun entnommen. Sie wurden, nachdem nekrotische Reststümpfe aus der vorangegangenen Teilhepatektomie reseziert worden waren, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um alle Stoffwechselvorgänge zu stoppen. Das Blut wurde bis zur sich unmittelbar anschließenden Zentrifugation (15 min, 4000g) in eisgekühlten Reagenzgläsern gesammelt. Die Lebern und das Plasma wurden entweder sofort zu Extrakten weiter verarbeitet oder bei -20 C aufbewahrt.

6.7 Herstellung der proliferationsaktiven Extrakte

6.7.1 Extrakte aus teilhepatektomierten Lebern

Drei Restlebern nach je 2/3-Teilhepatektomien wurden mit

der 4-fachen Menge Aqua bidest (Gewicht/Volumen) in einem Elvehjem-Potter bei 1500 U/min mit 10-12 Schlägen homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 0.1 N HCl auf pH 5.5 gebracht, im Hitzebad 20 min bei 95° C erhitzt und anschließend in einer Minifuge 15 min (4000g) zentrifugiert. Der Überstand wurde aufgenommen, der Niederschlag mit Aqua bidest wieder auf das Ausgangsvolumen gebracht und mit einem Spatel aufgerührt. Die Hitzebehandlung mit anschließender Zentrifugation wurde zweimal wiederholt, die vereinigten drei Überstände lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Der Extrakt wurde LT 200 genannt.

6.7.2 Extrakte aus dem Plasma teilhepatektomierter Ratten

14 ml Plasma wurden mit 0.1 N HCl auf pH 5.5 eingestellt, 20 min bei 95° C im Wasser erhitzt und anschließend 15 min bei 4000g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder aufgenommen, der Niederschlag mit Aqua bidest auf das ursprüngliche Volumen gebracht und mit einem Spatel aufgerührt. Die Hitzebehandlung mit anschließender Zentrifugation wurde noch zweimal wiederholt und die drei Überstände in einem Erlenmeyerkolben vereinigt. Der gesammelte Überstand wurde jetzt mit 0.1 N HCl auf pH 5.5 titriert und eine Stunde in einem Enzyminkubator bei 37° C mit 1 U Neuraminidase inkubiert. Zur Eliminierung der zugesetzten Neuraminidase wurde der Extrakt wieder für 20 min bei 95° C hitzedenaturiert, 20 min mit 4000g zentrifugiert, und nach dem Lyophilisieren bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Dieser Extrakt wurde PT-NEU 200 genannt.

6.8 Meßmethode zur Bestimmung der Proliferationsaktivität der verschiedenen Extrakte

Zwischen 11.00 und 12.00 Uhr wurden die lyophilisierten Extrakte je nach Löslichkeit mit 3-4ml 0.9% physiologischer Kochsalzlösung in 5ml Einwegspritzen aufgenommen und den Tieren in leichter Äthernarkose intraperitoneal injiziert. Die Tiere erhielten dann bis zum Zeitpunkt der Tötung Wasser und Altromin 1342 ad libitum.

21 Stunden nach Extraktspritzung, also zwischen 8.00 und 9.00 Uhr, wurden, wieder in leichter Äthernarkose, 50uCi 6-3H-Thymidin mit einer Hamiltonspritze intraperitoneal appliziert. Genau eine Stunde nach der Thymidininjektion wurden die Tiere in der unter 6.4. beschriebenen Weise entblutet, die Lebern entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

6.9 Isolierung der DNA aus Leberzellkernen

6.9.1 Gewinnung der Leberzellkerne

Zur Gewinnung der Leberzellkerne wurde eine modifizierte Methode nach Widnell und Tata angewandt(25).

Sämtliche Schritte wurden bei 0 -4°C durchgeführt. Die bei -20°C aufbewahrten Lebern wurden mit der 9-fachen Menge(G/V) einer 0.32 M Sucrose-Lösung(3mM MgCl₂ ; pH 7.3) versetzt und dann in einem Elvehjem-Potter bei einer Stempelumdrehungszahl von 1200/min durch 10-12 Schläge homogenisiert. Durch

die Auf- und Abbewegungen des Stempels im Glaszylinder passieren die Zellen den engen Zwischenraum zwischen Stempel und umgebender Glaswand. Dabei werden sie einer Scherkraft unterzogen, die der gewählten Stempelumdrehungszahl proportional ist.

Dann wurde das Homogenat durch ein 150u Filter passiert, um grobe Gewebstrümmern und Bindegewebsstränge zurückzuhalten. 2 ml Aliquots des Homogenats wurden einer leichten Zentrifugation unterzogen (10 min, 120g), der Überstand verworfen, der Niederschlag in 4ml einer 60% Sucrose-Lösung(G/V) resuspendiert und in Plastikröhrchen des Rotors SB405 einer IEC/B60 Ultrazentrifuge überführt.

Bei der anschließenden Ultrazentrifugation werden die einzelnen Zellkompartimente in Richtung der zur Rotorachse senkrecht stehenden Zentrifugalkraft beschleunigt, die der Rotorumdrehungszahl und dem Rotordurchmesser proportional ist. Entgegengesetzt gerichtet zur Zentrifugalkraft ist die Auftriebskraft der Teilchen, welche dem Gewicht der von ihnen verdrängten Flüssigkeit proportional ist. Ebenfalls entgegengesetzt gerichtet ist die Reibungskraft der Partikel, die von der Viskosität des Suspendatmediums abhängt.

Rotorumdrehungszahl und Viskosität, bzw. spez. Gewicht des Mediums wurden entsprechend den Vorschriften von Widnell und Tata(25) gewählt. Es resultiert ein Unterschied in der Teilchenwanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Kompartimente, und man erhält die gewünschte Fraktion als Niederschlag.

Nach der Ultrazentrifugation (30min, 110.000g) wurde der Überstand verworfen und als Niederschlag erhielt man intakte Leberzellkerne.

6.9.2 Extraktion der DNA

Der Zellkernniederschlag wurde in 5ml einer 0.25 M PCA-Lösung suspendiert, 30 min stehen gelassen und dann 15 min (4000g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag mit 1 ml 0.5 M NaOH versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die Probe wurde dann durch 20-maliges Aufziehen in einer 500 ul Eppendorfpipette gemischt, und 500 ul Aliquots in 4.5 ml einer 0.5 M PCA-Lösung aufgenommen und 30 min stehen gelassen.

Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min 4000g) wurden dem Niederschlag 5 ml 0.5 M PCA-Lösung zugefügt und das Ganze bei 95°C, 30 min erhitzt, was zu einer sauren Hydrolyse der DNA führt. Der Überstand wurde aufgehoben. PCA-Zugabe, Hitzebehandlung und Zentrifugation wurden einmal wiederholt und die beiden Überstände vereinigt. 1ml Aliquots der Lösung wurden in Scintillationsfläschchen abgefüllt und mit einer fertiggemischten Scintillationsflüssigkeit (Quickscint 212) vermischt. Von jeder Leber gelangten 6 Fläschchen zur Scintillations-Messung, außerdem 3 Null-Werte und 3 Standardwerte. Die Impulse/min wurden nach Null-Wert Subtraktion über den Standard zu Zerfällen/min (Zpm) umgerechnet. Um die spez. Aktivität angeben zu können, mußte zusätzlich der DNA-Gehalt des Meßansatzes bestimmt werden. Dies geschah durch photometrische DNA-Bestimmung mit Diphenylamin nach Burton(6).

Puringebundene Desoxyribose gibt mit Diphenylamin in einer Mischung von Essigsäure und Schwefelsäure eine blaue Verbindung unbekannter Natur.

Diphenylamin-Lösung: 1.5 g Diphenylamin werden in 100ml Eisessig gelöst und 1.5 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt. Das Reagenz wird in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Acetaldehyd-Lsg.: 2.0 ml Acetaldehyd wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und die Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Kurz vor Gebrauch der Diphenylamin-Lösung gibt man kalte Acetaldehyd-Lösung im Verhältnis 1:200 zu.

500 μ l Aliquots aus den vereinigten Überständen wurden mit 1 ml Diphenylamin-Lsg. vermischt, 22-24 Stunden in der Dunkelheit bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann bei 590 nm in einem Beckman-DB Photometer gemessen. Je Leber wurden 6 Proben gemessen. Die spezifische Aktivität wurde ausgedrückt in Zpm/ μ gDNA.

6.10 Messung der Anflutung des radioaktiven Thymidins

Um sicherzustellen, daß das Thymidin streng intraperitoneal gegeben wurde und auch wirklich in die Leber gelangt war, wurde eine Anflutungsmessung durchgeführt.

Je 1 ml der unter 6.9.1. beschriebenen Homogenate wurde in Scintillationsfläschchen abgefüllt. Nach Zugabe von 15 ml Quicksint-212 wurde gemischt und die Radioaktivität in der unter 6.9.1. beschriebenen Weise gemessen.

Da das Leberhomogenat von roter Farbe ist, kommt es zu einer teilweisen Absorption der emittierten Photoquanten. Dieser

Vorgang wird als Farb-Quenching bezeichnet. Bei parallelen Standardmessungen ergab sich ein Absorbtionsfaktor von 50%, der entsprechend berücksichtigt wurde. Die so ermittelten Anflutungswerte lagen bei 0.3-0.6 uCi/g Leber. Das bedeutet, daß bei einem Lebergewicht von etwa 10 g ungefähr 10% des applizierten Thymidins in die Leber gelangen.

7. Ergebnisse

7.1 Spezifische Aktivität des radioaktiven Thymidineinbaus in die DNA der Leberzellkerne bei den Kontrolltieren

Insgesamt 14 Tieren (200-220g) wurden zwischen 11.00 und 12.00 Uhr jeweils 4 ml physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal gespritzt. 21 Stunden nach Extraktgabe erhielten die Tiere 50uCi 6-3H-Thymidin i.p. und wurden eine Stunde später getötet. Der Mittelwert der spezifischen Aktivität betrug 16.8 Zpm/ugDNA. Der Wert der Standardabweichung war 5.3 Zpm/ugDNA. Die Anflutung des radioaktiven Thymidins ergab einen Mittelwert von 0.45 uCi/g Leber mit einer Standardabweichung von 0.04 uCi/g Leber.

7.2 Proliferationsaktivität des Faktors LT 200 aus teilhepatektomierten Rattenlebern

Insgesamt 4 Tieren wurde jeweils ein Extrakt LT 200 gespritzt. Der Mittelwert der spezifischen Aktivität betrug 40.6 Zpm/ugDNA. Der Wert der Standardabweichung war 6.3 Zpm/ugDNA. Die Anflutungsmessung des radioaktiven Thymidins ergab einen Mittelwert von 0.53 uCi/ gLeber. Dies bedeutet eine mittlere Steigerung der DNA-Synthese gegenüber den Kontrolltieren um den Faktor 2.4.

7.3 Proliferationsaktivität des Faktors PT NEU 200 aus dem Plasma teilhepatektomierter Ratten

Insgesamt 5 Tieren wurde jeweils ein Extrakt PT NEU 200 gespritzt. Die spezifische Aktivität ergab einen Mittelwert von 65.2 Zpm/ugDNA mit einer Standardabweichung von 17 Zpm/ugDNA. Der Mittelwert der radioaktiven Thymidinanflutung lag bei 0.46 uCi/g Leber bei einer Standardabweichung von 0.04 uCi/g Leber. Dies bedeutet eine Steigerung der DNA-Synthese gegenüber den Kontrolltieren um den Faktor 3.9. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst.

8. Besprechung

Eine sogenannte Extrakteinheit des Leberextrakts wurde bei Ruhenstroth- Bauer et al.(18) bei 100 g schweren Tieren aus 3 teilhepatektomierten Restlebern gewonnen. Ein Extrakt stammte aus 5.1 ± 0.2 g Leber (Feuchtgewicht). Eine Extrakteinheit führte bei 100 g schweren Testratten zu einer mittleren Steigerung der Einbauaktivität an Thymidin um den Faktor 3.3. Bei Goldberg et al.(7) wurde eine Extrakteinheit aus 7 ± 0.1 ml Plasma teilhepatektomierter 100 g schwerer Tiere gewonnen, der eine mittlere Steigerung der Einbauaktivität um den Faktor 4 bewirkte.

Bei der Extraktspritzung in 200-220g schwere Tiere wurde darauf geachtet, daß die Extraktmenge/Tier entsprechend dem Körpergewicht doppelt so groß war, nämlich 14.0 ± 0.1 ml Plasma und 10.0 ± 0.2 g Leber. In dieser Dosierung kam es

TABELLE

Extrakt	Thymidinanflutung uCl/gLeber S $\pm$ SD	Spez. Aktivität Zpm/ μ gDNA S $\pm$ SD	Steigerung gegen Kontrolle	Anzahl der Versuche
NaCl-Kontrolle, 4 ml Physiologische Kochsalzlösung	0.45 $\pm$ 0.04	16.8 $\pm$ 5.3		14
LT 200	0.53 $\pm$ 0.03	40.6 $\pm$ 6.3	2.4	4
PT NEU 200	0.46 $\pm$ 0.04	65.2 $\pm$ 17	3.9	5

verglichen mit Ruhenstroth-Bauer(18) und Goldberg(7) zu einer parallelen Steigerung der DNA-Synthese, wobei der Neuraminidase behandelte PT NEU 200 Extrakt auch etwas aktiver war als der Leberextrakt. Dies könnte allerdings durch einen toxischen Effekt mitextrahierter Gallebestandteile des Leberextrakts bedingt sein.

Damit werden an ausgewachsenen Ratten zum ersten Mal folgende Befunde erhoben.

- (1) 14 Stunden nach Teilhepatektomie wurde sowohl aus der Leber als auch aus dem Plasma durch Ansäuerung und anschließende Hitzedenaturierung ein proliferationsaktiver Faktor angereichert.
- (2) Dieser Faktor stimuliert in normalen Tieren 22 Stunden nach Extraktgabe die DNA-Synthese der Leberzellen 2.4- bzw. 3.9-fach.
- (3) Diese Stimulation ist aufgrund folgender Tatsachen bedeutsam: Das Leberwachstum in Ratten umfasst Hyperplasie und Hypertrophie bis zu einem Körpergewicht von etwa 70 g, was einem Alter von 3-4 Wochen entspricht. Zu diesem Zeitpunkt ist die entgültige Zahl der Leberzellen erreicht und die im weiteren Leben zustandekommende Volumenzunahme der Leber geschieht nur noch durch Hypertrophie. Man findet jedoch in 100 g schweren Normaltieren eine fast sechsfach höhere Einbauaktivität an radioaktivem Thymidin in die Leber-DNA (95 ± 31 Zpm/ μ gDNA) als in 200 g schweren Tieren (16.8 ± 5.3 Zpm/ μ gDNA). Woher dieser Unterschied

stammt, geht aus unseren Ergebnissen nicht unmittelbar hervor. Er könnte dadurch erklärt werden, daß bei den jungen Tieren eine DNA-Synthese stattfindet, die aber nicht mehr zu mitotischer Zellvermehrung führt, sondern zu einer Ploidieänderung in Richtung mehrkernig polyploider Zellen(24). Es besteht also auch noch bei 100 g schweren und etwa 4 Wochen alten Ratten eine endogene Stimulation der DNA-Synthese, die bei 200-220 g schweren und 8-10 Wochen alten Tieren nicht mehr gefunden wird, da zu diesem Zeitpunkt die endogene DNA-Synthese weitgehend zum Stillstand kommt(17). Die in vorliegender Arbeit gefundene Steigerung der DNA-Synthese wurde an Leberzellen gefunden, die keine endogene mitotische Aktivität zeigen und muß demnach als Induktion im Sinne eines *primum movens* gewertet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen mit hoher Wahrscheinlichkeit vermuten, daß dieser proliferationsaktive Faktor mit dem von Ruhenstroth-Bauer et al.(18) und Goldberg et al.(7) gefundenen, Hepatopoetin genannten Faktor identisch ist.

LaBrecque und Pesch(13) konnten einen Proliferationsfaktor aus 200-250 g schweren, teilhepatektomierten Ratten durch Ultrazentrifugation des Leberhomogenats anreichern. Diesen Faktor fanden sie allerdings auch in Normallebern von 60-90 g schweren Tieren. Das Testsystem unterschied sich weiterhin in einem wesentlichen Punkt von dem vorliegenden:

Sie zeigten die stimulierende Wirkung auf den radioaktiven Thymidineinbau an 34% teilhepatektomierten Ratten. Das bedeutet, daß eine proliferative Wirkung an Leberzellen gezeigt wird, die bereits einen endogenen Reiz zur Zellteilung erfahren haben. 1979 berichtete LaBrecque(14), daß das Molekulargewicht seines Faktors ungefähr 10 000 beträgt, sodaß sich auch im Molekulargewicht ein Unterschied zu Hepatopoetin ergibt. Starzl et al.(21) gewannen nach der LaBrecque'schen Methode einen Extrakt aus teilhepatektomierten Hundelebern. Wurde dieser Extrakt über eine 6-stündige Infusion in die Portalvene von Hunden gegeben, so konnte die dort zuvor durch portokavalen Shunt ausgelöste Atrophie der Hepatozyten wieder rückgängig gemacht werden. Auch eine leichte Erhöhung des Mitoseindex wurde beobachtet. Aber auch in diesem Fall wurde keine Proliferationsaktivität am Normaltier gefunden, sondern am komplexen Modell des Entzugs wichtiger hepatotropher Faktoren, die für das normale Wachstum und Gedeihen der Leberzellen notwendig sind(22). Morley und Kingdon(16) extrahierten durch einminütiges Kochen mit anschließender Zentrifugation einen Leber-Proliferationsfaktor aus dem Serum teilhepatektomierter Ratten. Doch auch dieser Faktor zeigt drei wesentliche Unterschiede zu Hepatopoetin:

- (1) Zu seiner Aktivierung ist die Einwirkung von Neuraminidase nicht erforderlich.
- (2) Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration mit 26 000 bestimmt.

(3) Durch längeres Kochen (3 min) verlor der Faktor wieder seine Aktivität.

Die Leberzellproliferationsforschung besitzt in verschiedener Hinsicht Bedeutung. Die zunehmende Isolierung Proliferations-aktiver Faktoren der Leber ist ein wichtiger Beitrag zur Beantwortung der Frage nach dem Auslöser der Regeneration. Weitere Versuche sind notwendig um herauszufinden, ob die An- und Abschaltung der Zellteilung durch ein und denselben oder mehrere Faktoren erfolgt. Ein wichtiger Aspekt dabei ist, daß die Erforschung der Regulationsvorgänge des regenerativen Zellwachstums eine Vorbedingung für das Verständnis des unkontrollierten, malignen Wachstums ist.

9. Zusammenfassung

Es wird die Anreicherung eines Leberzellproliferationsfaktors aus den Lebern(LT 200) und dem Plasma(PT NEU 200) 200 g schwerer, teilhepatektomierter Ratten beschrieben. LT 200 wurde 14 Stunden post operationem durch Homogenisierung, Ansäuerung und mehrfache Hitzedenaturierung gewonnen. PT NEU 200 wurde 14 Stunden post operationem aus 14 ml Plasma durch Ansäuerung, mehrfache Hitzedenaturierung und anschließender Neuraminidase-Behandlung erhalten. Werden die beiden Extrakte in normale 200 g schwere Ratten intraperitoneal gespritzt, erhöhen sie den Einbau an radioaktivem Thymidin in die DNA der Leberzellen im Vergleich zu Kontrolltieren um den Faktor 3.0. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist dieser Proliferationsfaktor mit dem von Ruhenstroth-Bauer et al.(18) und Goldberg et al.(7) beschriebenen Hepatopoetin identisch.

10. Literaturverzeichnis

Die mit großen Druckbuchstaben versehenen Zeitschriften-abkürzungen entsprechen denjenigen des Science Citation Index(SCI).

- (1) Barbiroli B. und Potter V.R. : DNA-Synthesis and interaction between controlled feeding schedules and partial hepatectomy in rats. SCIENCE, 172, 738-741, (1971)
- (2) Bollmann J.L.: Physiology of the liver. In: Diseases of the liver. Ed. L. Schiff, Pitman Med. Publ., S. 47-55, London 1956.
- (3) Bucher N.L., Swaffield M.N. und DiTroia J.F.:Influence of age upon incorporation of 2-¹⁴C-thymidine into DNA of regenerating rat liver. CANCER RES, 24, 509-512, (1964)
- (4) Bucher N.L.: Morphological and biological aspects. S.23-55. In: Regeneration of Liver and Kidney. Boston 1971
- (5) Bucher N.L.: Regulatory mechanisms. S.161-176. In: Regeneration of Liver and Kidney. Hrsg.: Bucher N.L. und Malt N.A. Boston 1971
- (6) Burton K.: A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamin reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. BIOCHEM, 62, 315-323, (1955).
- (7) Goldberg M., Strecker W., Feeny D.A. und Ruhenstroth-Bauer G.:Evidence for and characterization of a liver cell proliferationfactor from blood plasma of partially hepatectomized rats. HORMONE MET, 12, 94-96, (1980)
- (8) Goldberg M.: Doktorarbeit 1980, München.
- (9) Grisham J.W.: Morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: Autoradiography with ³H-Thymidine. CANCER RES, 22, 842-849, (1962)
- (10) Higgins G.M. und Anderson R.M.: Restoration of the liver of the white rat following surgical removal. ARCH PATH, 12, 186-202 (1931)
- (11) Jackson B.: ANAT REC, 134, 365, (1959)

- (12) Jaffee J.J.: ANAT REC, 120, 935, (1954)
- (13) LaBrecque D.R. und Pesch L.A.: Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. J. Physiol. 248, 237-284, (1975)
- (14) LaBrecque D.R.: The role of hepatotrophic factors in liver regeneration - a brief review including preliminary report of the in vitro effects of hepatic regenerative stimulator substance (SS). YALE J BIOL. 52, 49-60, (1977)
- (15) Moolten F.L. und Bucher N.L.: Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agent by cross circulation. SCIENCE, 158, 272-274, (1967).
- (16) Morley C.G. und Kingdon H.S.: Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats. BIOC BIOP A. 308, 260-275, (1973)
- (17) Nadal C. und Zajdella F.: Polyploidie somatique dans le foie du rat. EXP CELL RE, 42, 99-116, (1966)
- (18) Ruhenstroth-Bauer G., Goldberg M., Silz S. und Strecker W.: Anreicherung und Charakterisierung eines Leberzellproliferationsfaktors aus teilhepatektomierten Rattenlebern. H-S Z PHYSL, 359, 543-545, (1978)
- (19) Sigel B., Baldia L.B., Brightman S.A. et al.: Effect of blood flow reversal in liver autotransplantants upon site of hepatocyte regeneration. J CLIN INV. 47, 1231-1237, (1968)
- (20) Simpson G.E. und Finckh E.S.: The pattern of regeneration of rat liver after repeated partial hepatectomies. J.Path.Bact., 86, 361-370, (1963)
- (21) Starzl T.E., Terblanche J., Porter K.A., Jones A.F., Usui S., Mazzoni G.: Growth stimulating factor in regenerating canine liver. LANCET, 1(8108), 127-130, (1979)
- (22) Starzl T.E. und Terblanche J.: Hepatotrophic substances. In: Progress in Liver Disease. Hrsg.: Popper H. und Schaffner F., New York 1979,
- (23) Stowell R.E.: Nucleic acids and cytologic changes in regenerating rat liver. Arch. Path., 46, 164-178, (1948).
- (24) Tongendorf J., Trebin R. und Ruhenstroth-Bauer G.: Critique of the critical mass. AM J PATH, 80, 519-524, (1975).

- (25) Widnell C.C. und Tata J.R.: A procedure for the isolation of enzymically active rat-liver nuclei. BIOCHEM J, 92, 313-317, (1964)

Lebenslauf

1953	geboren in Bayreuth
1959-1963	Besuch der Grundschule in München, Berg-am-Laim
1963-1970	Besuch des Privat-Gymnasiums des Katholischen Familienwerks
1970-1973	Besuch des Oskar-von-Miller Gymnasiums in München
1973	Abitur
1973-1980	Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität München
1975	Physikum
1977	1.Teil der Ärztlichen Prüfung
1979	2.Teil der Ärztlichen Prüfung
1980	3.Teil der Ärztlichen Prüfung
Mai 1980	Approbation zum Arzt
Seit 1978	Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried (Abt. für Experimentelle Medizin)

